微生物学报 Acta Microbiologica Sinica 55(11):1445 - 1457; 4 November 2015 ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q http://journals.im.ac.cn/actamicrocn doi; 10. 13343/j.cnki.wsxb. 20150196

# 短小芽孢杆菌耐碱性 β-甘露聚糖酶基因的异源表达及其酶学 特性

唐嘉婕<sup>1,2</sup>,郭苏<sup>1,2</sup>,王伟<sup>1,2</sup>,魏巍<sup>1,2</sup>\*,魏东芝<sup>1,2</sup> 华东理工大学,<sup>1</sup>生物工程学院,<sup>2</sup>生物反应器工程国家重点实验室,上海 200237

摘要:【目的】本研究报道了一种新颖的耐碱性 β-甘露聚糖酶基因的异源表达并研究其酶学特性,为其工业应用奠定基础。【方法】通过基因同源性分析以及染色体步移技术,从短小芽孢杆菌 Nsic-2 中克隆得到甘露聚糖酶基因  $(man_B)$ 。然后分别将  $man_B$ 基因在大肠杆菌 BL21 (DE3)和枯草芽胞杆菌 WB800N 中进行表达,并研究其酶学特性。【结果】克隆得到的  $man_B$ 基因序列有一个含 1104 bp 的开放阅读框,编码一种含有 367个氨基酸的甘露聚糖酶(Man<sub>B</sub>)。经预测其蛋白序列 N 末端有一个含有 31 个氨基酸的信号肽。将 Man<sub>B</sub>的氨基酸序列进行同源性分析,发现其与来源于短小芽孢杆菌 CCAM080065 的甘露聚糖酶具有很高的一致性,可以推测 Man<sub>B</sub>属于糖苷水解酶家族 26。 $man_B$ 基因在大肠杆菌 BL21 (DE3)中成功地表达,得到甘露聚糖酶最高酶活为 11021.3 U/mL。与其它甘露聚糖酶比较,Man<sub>B</sub> 在碱性条件下表现出较高的稳定性,在pH6.0 – 9.0 之间酶活相对稳定。纯化后的 Man<sub>B</sub>比活可达4191 ± 107 U/mg。酶反应动力学参数  $K_m$  和  $V_{max}$ 分别为 35.7 mg/mL 和 14.9  $\mu$ mol/(mL·min)。同时,在枯草芽胞杆菌 WB800N 中也成功地实现了重组蛋白Man<sub>B</sub>的分泌表达。【结论】β-甘露聚糖酶基因成功实现异源表达,并得到其酶学性质。本文是首次报道从臭豆腐卤液中分离菌株,克隆表达甘露聚糖酶,并描述其酶学特性。Man<sub>B</sub>在碱性条件下的酶活稳定性,使得其在工业应用中具备较高的潜在应用价值。

**关键词:**短小芽孢杆菌,β-甘露聚糖酶,基因克隆,酶学特性,枯草芽孢杆菌表达中图分类号:0936 文章编号:0001-6209(2015)11-1445-13

半纤维素是一系列线性的或带支链的异型多聚糖,包括己糖(如葡萄糖,甘露糖和半乳糖),戊糖(如木糖和阿拉伯糖)以及糖酸<sup>[1]</sup>。软木和硬木中的半纤维素分别主要为甘露聚糖和木聚糖<sup>[2]</sup>。β-甘露聚糖的主链是由β-1,4-糖苷键连接而成的 D-吡喃甘露糖(或甘露糖和葡萄糖的混合物),还有可能

含有由 α-1,6-糖苷键连接的半乳糖支链<sup>[3]</sup>。存在于软木中的甘露聚糖主要为半乳葡萄甘露聚糖,其含有甘露糖,葡萄糖和半乳糖残基的比例为 3:1:1;而硬木中的甘露聚糖主要为葡甘露聚糖,其中甘露糖和葡萄糖残基的比例通常为 3:1<sup>[4]</sup>。甘露聚糖的彻底水解需要几种酶的共同协作才可以完成。首

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金(WF1214047);国家自然科学基金(C050203-31200596);国家高技术研究发展计划 (2013AA102109);国家自然科学重大项目(2012ZX09304009)

<sup>\*</sup>通信作者。Tel/Fax: +86-21-64251803; E-mail: lyuwei-1982@hotmail.com

作者简介:唐嘉婕(1987-),女,河北人,硕士研究生,主要研究微生物基因克隆与表达。E-mail: tangjiajie2892@sina.com

先,外切 β-1,4-甘露聚糖酶(EC 3.2.1.78)将 β-1, 4-糖苷键连接而成的甘露糖主链降解[5]:然后由此 释放出的甘露寡糖再由 β-甘露聚糖酶(EC 3.2.1.25),α-半乳糖苷酶(EC 3.2.1.22),β-葡萄 糖苷酶(EC 3.2.1.21)和乙酰甘露聚糖酯酶(EC 3.1.1.6)进一步地水解成甘露糖<sup>[6]</sup>。β-甘露聚糖 酶是水解甘露糖和异聚甘露醇中 β-1.4-D-甘露糖苷 键的关键酶,并由此释放出低聚甘露糖。根据氨基 酸序列和疏水集团聚类分析,可以将大多数 β-葡萄 糖苷酶归类到糖苷水解酶家族 5、26 和 113[3]。内 切β-1,4-甘露聚糖酶在基础研究,生物材料转化和 各种工业应用中都能发挥重要的作用,如软木纸浆 的漂白.食品及饲料添加剂和开采石油等[7-9]。在 造纸工业中,内切β-1,4-甘露聚糖酶与木聚糖酶协 同作用,可以提高纸浆的亮度[10]。在动物饲养中, 内切 β-1,4-甘露聚糖酶可以减少饲料中的抗营养因 子——甘露聚糖聚合物[11]。β-甘露聚糖酶还可以 应用于处理即溶咖啡时的咖啡废物回收。

日益增长的对可再生资源重复利用的需求,使得 β-甘露聚糖酶吸引了众多工业领域的目光<sup>[12-13]</sup>。近几年,已有人报道过利用重组大肠杆菌生产甘露聚糖酶<sup>[14-16]</sup>。而对于将甘露聚糖酶在枯草芽孢杆菌中表达的报道很少。这也是由于利用枯

草芽胞杆菌作为宿主菌有一定的限制性:(1)枯草芽孢杆菌自身产生的分泌蛋白可以识别并降解异源重组蛋白;(2)重组的枯草芽孢杆菌表达系统具有不稳定性[17]。以上这些障碍可以通过构建蛋白质缺陷菌株和导入 Theta 型复制质粒来克服。

我们曾经通过富集培养的方法从臭豆腐卤液中筛选出六株菌株<sup>[18]</sup>,其中有一株具备高甘露聚糖水解能力的短小芽孢杆菌 Nsic-2。在本研究中,我们从短小芽孢杆菌 Nsic-2 中克隆得到 β-甘露聚糖酶基因,在大肠杆菌中进行了表达,得到酶活较高的β-甘露聚糖酶。还进一步研究了其酶活特性,包括酶的稳定性,最适反应温度,最适反应 pH 等。并且,在枯草芽孢杆菌表达系统中,利用可诱导的启动子 Pgrac,实现了β-甘露聚糖酶的分泌表达。这是对来源于短小芽孢杆菌的甘露聚糖酶及其酶活特性的首次报道。并且,所得的甘露聚糖酶及其酶活特性的首次报道。并且,所得的甘露聚糖酶的两个重要特性(碱性条件下的稳定性和在枯草芽胞杆菌中分泌表达),都显示了其潜在的研究价值。

# 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 菌株及质粒**:本研究中用到的菌株和质粒详细信息见表 1。

表 1. 本研究中所用到的菌株与质粒

Table 1. The bacterial strains and plasmids used in this study

| Strains and plasmids                             | Relevant features  | Source or Reference |  |
|--|--|---------------------|--|
| Strains  |  |                     |  |
| E. coli DH5α                                     | F̄ψ80lacZΔM15Δ (lacZYA-argF) U169 end<br>A1 rec<br>A1 hsd<br>R17 ( $\rm r_k^-, m_k^-$ ) supE44λ̄thi-1 gyr<br>A96 rel<br> | BRL                 |  |
| E. coli BL21 (DE3)                               | F-,ompT, hsdS (rBB-mB), gal, dcm (DE3)   | BRL                 |  |
| Bacillus pumilus Nsic-2                          | wild strain screened from stinky tofu brine  | CCTCC AB 2013050    |  |
| B. subtilis WB800N                               | apr his npr eglS (DELTA) 102 bglT/bglS (DELTA) EVCm <sup>r</sup>   | Mo Bi Tec           |  |
| BL21-pET-28a- $man_{\rm B}$                      | Recombinant E. coli BI21 strains, carrying plasmid pET-28a- $man_{\rm B}$  | This study          |  |
| BL21-pET-32a- $man_{\rm B}$                      | Recombinant E. coli BI21 strains, carrying plasmid pET-32a- $man_{\rm B}$  | This study          |  |
| BL21-pET-42a- $man_{\rm B}$                      | Recombinant E. coli BI21 strains, carrying plasmid pET-42a-man <sub>B</sub>  | This study          |  |
| ${\rm WB800N\text{-}pHT43\text{-}}{man}_{\rm B}$ | Recombinant B. subtilis WB800N strains, carrying plasmid pHT43- $man_{\rm B}$  | This study          |  |
| Plasmids   |  |                     |  |
| pMD19-T  | Cloning vector; Amp <sup>r</sup>   | TaKaRa              |  |
| pET-28a-c( + )                                   | E. coli expression vector; Kan <sup>r</sup>  | Novagen             |  |
| pET-28a- $man_{\rm B}$                           | pET-28a based vector, carrying mature mannanase gene; Kan <sup>r</sup>   | This study          |  |
| pET-32a-c( + )                                   | E. coli expression vector; Amp <sup>r</sup>  | Novagen             |  |
| pET-32a- $man_{\rm B}$                           | pET-32a based vector, carrying mature mannanase gene; Amp <sup>r</sup>   | This study          |  |
| pET-42a-c( + )                                   | E. coli expression vector; Kan <sup>r</sup>  | Novagen             |  |
| $\mathrm{pET-}42\mathrm{a-}man_{\mathrm{B}}$     | pET-42a based vector, carrying mature mannanase gene; Kan <sup>r</sup>   | This study          |  |
| pHT43  | Bacillus-E. coli shuttle vector; vector for extracellular expression; Amp <sup>r</sup> and Cm <sup>r</sup>               | Mo Bi Tec           |  |
| $\mathrm{pHT43}\text{-}man_{\mathrm{B}}$         | pHT43 based vector, carrying mature mannanase gene; Amp <sup>r</sup> and Cm <sup>r</sup>                                 | This study          |  |

1.1.2 主要试剂与仪器:本研究用到的细菌基因组提取试剂盒,细菌质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒均购自于 Axygen 公司。TaKaRa LA PCR™ in vitro Cloning Kit, T4 DNA ligase, DNA marker, *Taq* DNA Polymerase 和 *Bam*H I 等限制性内切酶均购自于大连宝生物公司。Protein marker 购于 Fermentas 公司。IPTG、氨苄青霉素、卡那霉素和氯霉素购于 Amresco 公司。商品甘露聚糖酶 ECONASE MP 1000

由里氏木霉分泌。角豆胶购于 Sigma 公司。电热恒温培养箱购于上海跃进医疗器械厂。核酸电泳仪购于北京六一仪器厂。恒温摇床购于华利达公司。PCR 仪购于 Eppendorf 公司。凝胶成像系统购于SYNGENE 公司。pH 计购于上海雷磁仪器厂。

**1.1.3 引物与培养基:**本研究中所用的引物及其序列见表 2。引物设计使用 Primer Premier 5.0 软件。引物于生工生物工程股份有限公司(上海)合成。

表 2. 本研究中所用到的引物

Table 2. Primers used in this study

| Primers     | Nucleotide sequences (5′→3′)                                       | Amplicon size/kb |
|-------------|--|------------------|
| 16s-U       | CCTACGGGAGGCAG   | 1.2              |
| 16s-D       | ACGGGCGTGTGTAC   | 1. 2             |
| man-U1      | TGCTSAGCAAAATYGC   | 0. 3             |
| man-D1      | GTTTTRAARTCTCKGTT  | 0.3              |
| man-U       | ATGGGGGAGTTGCATTTGTTTA   | 1.0              |
| man-D       | TCACTCAACGATTGGCGTTAAA   | 1.0              |
| pET28-man-U | $CG\underline{GGATCC}$ ATGGGGGAGTTGC                               | 1.0              |
| pET28-man-D | ${\tt CC}\underline{{\tt GAGCTC}}{\tt TCACTCAACGATTGGCG}$          | 1.0              |
| pET32-man-U | $CG\underline{GGATCC}ATGGGGGAGTTGC$                                | 1.0              |
| pET32-man-D | ${\tt GC} \underline{{\tt AAGCTT}} {\tt TCACTCAACGATTGGCG}$        | 1.0              |
| pET42-man-U | CG <u>CATATG</u> GGGGAGTTGCATT                                     | 1.0              |
| pET42-man-D | ${\tt GC}\underline{{\tt GAGCTC}}{\tt TCACTCAACGATTGGCG}$          | 1.0              |
| pHT43-man-U | $GCAT\underline{GGATCC}CATACTGTGTCGCCTGTGAAT$                      | 1.0              |
| pHT43-man-D | ${\tt GCAT} \underline{{\tt GACGTC}} {\tt TCACTCAACGATTGGCGTTAAA}$ | 1.0              |

<sup>\*</sup> Restriction sites incorporated into primers are underlined, and R = A/G, S = C/G, Y = C/T, K = G/T

LB 培养基的成分包括:1% 的氯化钠,1% 的胰蛋白胨,0.5% 的酵母粉,用去离子水配制,于121 ℃高压灭菌 20 min。

### 1.2 β-甘露聚糖酶的基因克隆

首先,将短小芽孢杆菌 Nsic-2 于 LB 培养基中过夜培养。第二天取适量菌液,用 Axygen AxyPrep细菌基因组 DNA 小量试剂盒提取其基因组 DNA。

接着,基于 GenBank 数据库中四种来源于典型 芽孢杆菌的 β-甘露聚糖酶基因保守序列(图 1),设计简并引物 man-U1/man-D1,扩增得到 Nsic-2 中甘露聚糖酶基因的部分序列。扩增条件为:95 ℃ 5 min;94 ℃30 s,52 ℃30 s,72 ℃40 s,30 个循环;72 ℃10 min。扩增产物于华大基因进行测序。

然后,通过染色体步移和巢式 PCR,用 TaKaRa LA PCR<sup>™</sup> in vitro Cloning Kit 扩增得到完整的 β-甘露聚糖酶基因序列( $man_B$ ),并进行测序。PCR 扩增条件为:95  $^{\circ}$ 55 min;94  $^{\circ}$ 630 s,56  $^{\circ}$ 630 s,72  $^{\circ}$ 680 s,

30 个循环;72 ℃10 min。将扩增产物与 pMD19-T simple vector 于 16 ℃下过夜连接,得到质粒 pMD-man<sub>B</sub>,并转化到感受态的大肠杆菌 DH5α 中。

# 1.3 β-甘露聚糖酶基因在大肠杆菌中的表达及重 组蛋白纯化

以 Nsic-2 的基因组 DNA 为模板,分别用三对引物 pET28-man-U/pET28-man-D,pET32-man-U/pET32-man-D 和 pET42-man-U/pET42-man-D 扩增  $man_B$  基因。扩增 产物分别与载体 pET-28a,pET-32a 和 pET-42a 进行 重组(图 2)。重组质粒转化到感受态的大肠杆菌 BL21 中。大肠杆菌的制备和质粒转化方法参见分子克隆实验指南第三版<sup>[19]</sup>。重组菌 (BL21-pET-28a- $man_B$ , BL21-pET-32a- $man_B$  和 BL21-pET-42a- $man_B$ ) 在 含有适当浓度抗生素 (浓度为 50  $\mu$ g/mL 的卡那霉素或 100  $\mu$ g/mL 的氨苄青霉素)的 LB 培养基中进行过夜培养。培养至适当菌液浓度 ( $OD_{600} \approx 0.5$ )时,在 20  $\mathbb{C}$ 条件下用 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导培养 16 16

诱导培养后收集菌体,进行 SDS-PAGE 分析。剩余全部菌体进行超声破碎并用镍柱纯化系统 Ni-NTA

Purification System 进行纯化<sup>[20]</sup>。纯酶用 Bradford 法测定酶蛋白的浓度。

```
Bacillus pumilus (JF791253.1)
                                              ···513··· GCCATGCTCAGCAAAATTGCTGACGC···538···
Bacillus subtilis W23 (CP002183.0)
                                              ···498··· GCCATGCTCAGCAAAATTGCTGACGC···523···
Bacillus licheniformis CICC10338 (GQ925779.1)
                                              ···495···GCGATGCTGAGCAAAATCGCGGACGC···520···
Bacillus amyloliquefaciens CICC 22383 (GQ859478.1)
                                                     GCCTTGCTCAGCAAAATCGCCGACGC...523...
Consensus
Bacillus pumilus (JF791253.1)
                                                     GCCAACCGAGATTTTAAAACTGAT
Bacillus subtilis W23 (CP002183.0)
                                                               CGAGA
Bacillus licheniformis CICC10338 (GQ925779.1)
                                                      GCCAAC!
                                                                GAGA
                                                                GAGA
Bacillus amyloliquefaciens CICC 22383 (GQ859478.1)
Consensus
```

图 1. 序列比对

Figure 1. Gene sequences analysis. Comparison of four reported mannanase genes from different resources. The identical nucleotides are indicated by blue boxes. The conserved sequences which were analyzed to design degenerate primers are indicated by boldfaces.

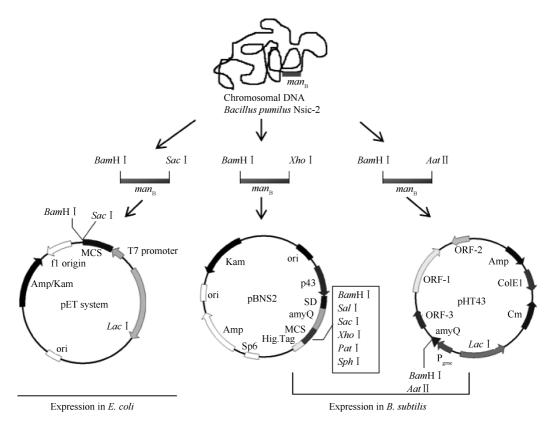


图 2. 大肠杆菌和枯草芽孢杆菌表达载体的构建

Figure 2. Cloning strategy for the construction of expression vectors in E. coli and B. subtilis.

#### 1.4 β-甘露聚糖酶活性测定

利用 3,5-二硝基水杨酸法(即 DNS 法)来测定  $\beta$ -甘露聚糖酶( $Man_B$ )的活性。首先用 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液配制浓度为 5 g/L 的角豆胶溶液(pH7.0)。取 900  $\mu$ L 角豆胶溶液与 100  $\mu$ L 适当稀

释的酶液混合,于 40 ℃孵育 10 min,孵育后立即以 0.5 mL DNS 试剂终止反应。然后,将混合液于沸水 浴中孵育 10 min,流动水下迅速冷却至室温。最后在分光光度计波长 540 nm 下,测定混合液的光密度。本实验设 3 次平行实验。空白对照的反应体系

中只有 900  $\mu$ L 角豆胶溶液,用 DNS 处理后再加入 100  $\mu$ L 适当稀释的酶液。酶活单位用 U 表示。1 U 定义为在 40  $\infty$ 条件下,每分钟释放 1  $\mu$ mol 还原糖 所需的酶量。

#### 1.5 酶学性质的研究

对纯化后的酶进行酶学性质的研究。β-甘露聚 糖酶的最适反应温度是在 pH7.0 的条件下测定的, 分别测定其在 30、35、40、45、50、55、60、65 和 70 ℃ 下反应的酶活。最适反应 pH 是在 40 ℃的条件下 测定的,分别测定其在不同 pH 值(2.0-10.0) 的缓 冲液中反应的酶活。热稳定性是将酶于不同温度 (30、35、40、45、50、55、60、65 和 70 ℃)下,分别保温 15、30、60 和 90 min 后,在 pH7.0 的条件下测定其 残余酶活。pH 稳定性是在 40 ℃条件下,将酶预先 在不同 pH 的缓冲液中保温 30 min 后,测定其残余 酶活。热稳定性和 pH 稳定性的测定均以初始酶活 为100%,测定其保温后的相对酶活。金属离子和 化学试剂对酶活的影响是在 40 ℃ 条件下测定的。 在反应体系中分别加入不同浓度的相应试剂,利用 DNS 法测定酶活。实验中以没有添加任何金属离子 和化学试剂的反应体系为空白对照。此外,还测定了 β-甘露聚糖酶对蛋白酶的抵抗力。将 β-甘露聚糖酶 分别与胃蛋白酶(pH2.0,10 μg/mL,以 100 mmol/L 的甘氨酸-盐酸缓冲液配制),胰蛋白酶(pH7.0,10 μg/mL,以100 mmol/L的磷酸盐缓冲液配制)和蛋 白酶 K(pH7.0,10 μg/mL,以 100 mmol/L 的磷酸盐 缓冲液配制)于37 ℃反应2 h,用 DNS 法测定其反 应酶活。以未加入蛋白酶的反应体系为空白对照。 上述实验均重复3次,每次均设3个平行样品。3 次测定的平均值作为最终酶活。

# 1.6 β-甘露聚糖酶基因在枯草芽孢杆菌中的表达

以 Nsic-2 的基因组 DNA 为模板,利用引物 pHT43-man-U/pHT43-man-D 扩增  $man_B$  基因,与 pHT43 载体(含有可诱导启动子 Pgrac)进行重组,得到重组质粒 pHT43- $man_B$ (图 2),并转化到感受态的枯草芽孢杆菌 WB800N中。重组菌株(WB800N-pHT43- $man_B$ )于 37 ℃下,在含有 15  $\mu$ g/mL 氯霉素的 LB 培养基中过夜培养。培养至适当菌液浓度( $OD_{600}\approx 0.5$ )时,在 37 ℃条件下用 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导培养 24 h。诱导培养后收集菌液,进行 SDS-PAGE 分析。

# 2 结果和分析

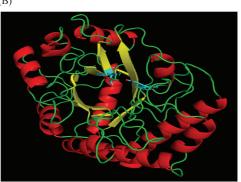
#### 2.1 man<sub>B</sub>基因克隆与序列分析

利用简并引物 man-U1/man-D1 扩增得到一段 长度为 250 bp 的基因片段,其序列与短小芽孢杆菌 (CCAM080065) 来源的 GH 26 β-1,4-mannanase 相 似度很高。通过巢式 PCR 和染色体步移,扩增得到 一段长度为 1421 bp 的基因片段。对基因序列 (man<sub>R</sub>, GenBank accession number: KC436314) 进行 分析,其序列含有一个1104 bp 的开放阅读框,编码 367 个氨基酸,起始密码子为 ATG,推测有一个核糖 体结合位点(AAGGAA), GC 含量为 42%。经 SignalP Server 推测,其蛋白序列 N 末端有一段31 个 氨基酸的信号肽且第31个和32个氨基酸之间为信 号肽酶切位点(图 3-A)。经 BLASTp 预测其蛋白含 有一个糖苷水解酶家族 26 的催化区域。系统发育 树(图4)显示其氨基酸序列与短小芽孢杆菌 CCAM080065(AE079931.1)和枯草芽孢杆菌 WY34 (ADW78259.1)来源的甘露聚糖酶氨基酸序列非常 相近。经 ExPASy 预测,蛋白 Mang 的分子量约为 41.5 kDa,pI 值为 6.0。我们推测序列比对中保守 的氨基酸区域可能与蛋白的稳定性及催化功能相 关。利用 SWISS-MODEL server 预测 Mang的三维结 构,发现其催化区域有一个(β/α)<sub>8</sub>-barrel 折叠,这 是糖苷水解酶家族 26 蛋白中的保守结构(图 3-B)。 B. subtilis Z-2 来源的甘露聚糖酶催化谷氨酸残基 (Glu<sup>167</sup>和 Glu<sup>266</sup>)<sup>[14]</sup>与 Man<sub>B</sub>的催化谷氨酸残基 (Glu<sup>198</sup>和 Glu<sup>297</sup>)如图 3-B 所示。

#### 2.2 重组蛋白在大肠杆菌中的表达及其纯化

本研究中,利用大肠杆菌表达载体 pET-28a, pET-32a 和 pET-42a 来表达外源蛋白。将重组质粒 pET-28a- $man_B$ , pET-32a- $man_B$  和 pET-42a- $man_B$  转化 到大肠杆菌 BL21 (DE3)/pLys 中,以获得重组蛋白 (Man\_B)。若将  $man_B$ 在不同的温度下诱导表达,以 BL21-pET-28a- $man_B$  重组菌株为例,将其在 37 ℃下诱导表达时,无法检测到甘露聚糖酶活性,重组蛋白几乎表现为包涵体;在 30 ℃下诱导表达时,可以检测到微量的甘露聚糖酶活性(图 5-B)。若将其在 20 ℃下诱导培养 2 h,则在菌体裂解液的上清中可以明显检测到甘露聚糖酶活性。若将诱导时间延长至 6 h,菌体裂解液上清中甘露聚糖酶活性可达





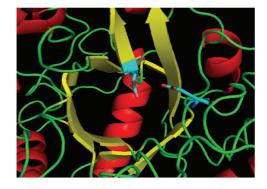


图 3. 氨基酸保守序列比对及酶的三维结构

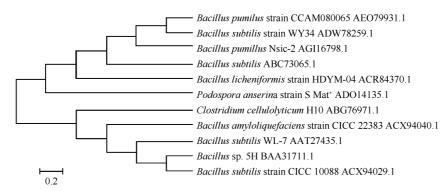
Figure 3. Conserved sequence alignment of amino acid sequence of  $Man_B$  and the three-dimensional structure of this enzyme (A) The consensus amino acid residues of  $Man_B$  and some homologous mannanase were aligned with FASTA and GENEDOC. The signal peptide sequence, the degenerate primers sequence and the catalytic glutamate residues of  $\beta$ -mannanase from B. subtilis Z-2 (position 167aa and 266aa) [14] are boxed in this figure. (B) The three-dimensional structure of  $Man_B$  with the catalytic glutamate residues ( $Glu^{198}$ ,  $Glu^{297}$ ).

318.6 U/mL。当诱导时间延长至 16 h,菌体裂解液上清中的甘露聚糖酶酶活可达最高值,为 11021.3 U/mL。而将没有整合有 man<sub>B</sub>基因的 pET 空载体转化到大肠杆菌 BL21 (DE3)/pLys 中进行表达,是无法检测到甘露聚糖酶活性的。没有经 IPTG 诱导的重组菌株经培养后,也无法检测到甘露聚糖酶活性。由此证明,甘露聚糖酶基因成功地在大肠杆菌中获得了表达。

将  $Man_B$ 进行 SDS-PAGE 分析,如图 5 所示,所得重组蛋白大小与预测的  $Man_B$ 大小十分相近(图 5-A)。由于载体 pET-32a 中融合有一个 109 个氨基

酸的硫氧还蛋白标签,所以重组菌株 BL21-pET-32a-man<sub>B</sub> 表达的重组蛋白 Man<sub>B</sub>与其它两株重组菌相比,分子量较大,约为 54 kDa。

经 DNS 法测定,3 种重组菌株 BL21-pET-28a-man<sub>B</sub>, BL21-pET-32a-man<sub>B</sub> 和 BL21-pET-42a-man<sub>B</sub> 所表达的甘露聚糖酶酶活分别为 11021.3 U/mL, 4524.3 U/mL 和 6539.9 U/mL。将 50 mL 重组菌株 pET-28a-man<sub>B</sub> 表达的重组蛋白经镍柱纯化,测得纯酶比活为 4191.3 U/mg。与粗酶液相比,纯化得率为 5.4%,纯度提高 27 倍。纯酶液经 SDS-PAGE 分析,可以看到分子量大小与预测相一致的单一条带



#### 图 4. 系统发育树

Figure 4. Rooted phylogenetic tree of  $Man_B$  protein comparison. The Neighbor Joining tree was constructed by using CluatalW and MEGA 4.0 with the amino acid sequences of  $\beta$ -mannanase from various strains. Bootstrap support was assessed by 1000 repetitive resampling of the data set and construction of the phylogeny.

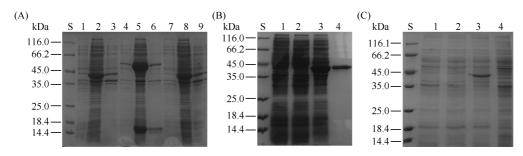


图 5. 大肠杆菌和枯草芽孢杆菌表达的重组蛋白 SDS-PAGE 分析

Figure 5. SDS-PAGE of the recombinant protein in *E. coli* and *B. subtilis* (A) SDS-PAGE of Man<sub>B</sub> with different plasmid in *E. coli*. Lane S, standard marker proteins; lane 1, 2, 3; protein expression profiles of BL21 (DE3)/plys containing the empty-vector pET-28a, supernatant of cell lysate and precipitation of cell lysate (BL21-pET-28a-man<sub>B</sub>); lane 4, 5, 6; protein expression profiles of BL21 (DE3)/plys containing the empty-vector pET-32a, supernatant of cell lysate and precipitation of cell lysate (BL21-pET-32a-man<sub>B</sub>); lane 7, 8, 9; protein expression profiles of BL21 (DE3)/plys containing the empty-vector pET-42a, supernatant of cell lysate and precipitation of cell lysate (BL21-pET-42a-man<sub>B</sub>). (B) SDS-PAGE of BL21-pET-28a-man<sub>B</sub> with different induction temperature in *E. coli* (induction time 16 h). Lane S, standard marker proteins; lane 1, 2, 3; supernatant of cell lysate (37°C, 30°C and 20°C); lane 4, purified Man<sub>B</sub>. (C) SDS-PAGE of the recombinant protein in *B. subtilis* WB800N. Lane S; standard marker proteins; lane 1, 2, 3, 4; protein expression profiles of WB800N-pHT43 containing the empty-vector, supernatant of fermentation broth without induction, supernatant of fermentation broth after induction and cell lysate after induction.

(约42.0 kDa)(图5-B)。

# 2.3 纯化后的重组甘露聚糖酶酶学性质

由于 BL21-pET-28a-man<sub>B</sub> 表达的甘露聚糖酶酶 活最高,所以我们以它表达的重组蛋白为例,研究其纯酶的酶学特性。

如图 6 所示,纯化后的蛋白  $Man_B$ 在 pH6.0 条件下酶活最高,且在 pH6.0-9.0 之间酶活较高,仍能保留最高酶活 75%以上的活性。在 pH6.0-8.0 之间,其酶活表现出高度的稳定性。 $Man_B$ 的最适反应温度为 40 °C。将其在 40 °C 孵育 1 h 后,仍能保留初始酶活的 90% 以上。将其在 70 °C 孵育 90 min,其酶活几乎为零。

不同的金属离子或化学试剂对酶活的影响见表3。浓度较低(1 mmol/L)的金属离子,Mg²+、K+、Ni²+和 Co²+对酶活稍有抑制或没有影响,Zn²+可以稍微提高酶活。当金属离子浓度较高时(5 mmol/L 和 10 mmol/L),Mg²+可以明显地抑制酶活。不同浓度(1 mmol/L,5 mmol/L 和 10 mmol/L)的 Ca²+和Mn²+都可以提高酶的活性。浓度为 10 mmol/L 的Cu²+、Ni²+和 Co²+都可以严重地降低酶的活性。异丙醇、吐温 – 80、吐温 – 20 和 TritonX-100 对酶活没有明显影响。SDS 可以完全地抑制酶活性。还原剂DTT 可将酶活提高为原来的 154%。甲醇和二甲基亚砜可以强烈抑制酶活。

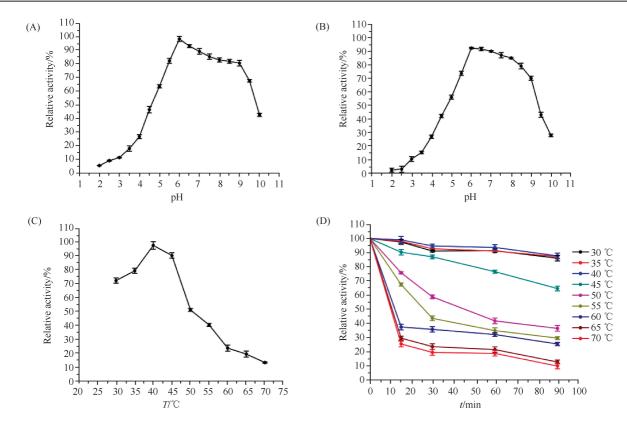


图 6. Man<sub>R</sub>的酶学性质

Figure 6. Characterization of recombinant  $Man_B(A)$  Effect of pH on  $Man_B$  activity assayed at  $40^{\circ}$ C in buffers ranging from pH2.0 – 10.0. (B) Effect of pH on the stability of  $Man_B$  activity. After incubation at  $40^{\circ}$ C for 30 min in buffers ranging from pH2.0 – 10.0. (C) Effect of temperature on  $Man_B$  activity measured at pH7.0. (D) Thermostability of  $Man_B$ . Each value represents the mean  $\pm$  SD of triplicates.

表 3. 不同的金属离子或化学试剂对 Man<sub>B</sub>酶活的影响

Table 3. Effect of metal ions, reagents and chemical compounds on the Man<sub>B</sub> activity

| Metalions or Chemical | Relative activity/% a |                     |                  |
|-----------------------|-----------------------|---------------------|------------------|
| compounds             | 1 mmol/L              | 5 mmol/L            | 10 mmol/L        |
| None                  | 100. 0                | 100. 0              | 100. 0           |
| $Mg^{2+}$             | 90. $4 \pm 2$ . 1     | $78.5 \pm 2.7$      | 67. 2 ± 1. 9     |
| Ca <sup>2 +</sup>     | $125.3 \pm 2.0$       | 119. $0 \pm 2.8$    | 115. $3 \pm 2.1$ |
| K <sup>+</sup>        | 94. $7 \pm 2.6$       | $95.9 \pm 2.7$      | 98. $5 \pm 2.1$  |
| Cu <sup>2 +</sup>     | $78.5 \pm 3.1$        | $70.9 \pm 1.9$      | 69. 2 ± 2. 9     |
| Zn <sup>2 +</sup>     | $103.0 \pm 3.5$       | 99. 1 ± 2. 9        | 97. 5 ± 2. 5     |
| Ni <sup>2 +</sup>     | 98.7 ± 1.9            | 97. $1 \pm 2.2$     | $11.9 \pm 0.9$   |
| Mn <sup>2 +</sup>     | 101. 8 ± 2. 9         | $109.5 \pm 2.2$     | $110.0 \pm 1.0$  |
| Co <sup>2 +</sup>     | 97. $3 \pm 2.4$       | 96. $1 \pm 2.7$     | 29. 7 ± 1. 2     |
| SDS                   | $0.01 \pm 0.01$       | ND                  | ND               |
| DTT                   | $137.3 \pm 2.6$       | 148. 2 ± 1. 9       | $154.5 \pm 1.3$  |
| Chemical compounds    |                       | Relative activity/% |                  |
| None                  |                       | 100. 0              |                  |
| Isopropanol           |                       | 94. 9 ± 2. 1        |                  |
| Tween-80              |                       | 98. $7 \pm 2.9$     |                  |
| Tween-20              |                       | 95. $1 \pm 3.0$     |                  |
| TritonX-100           |                       | 90. 3 ± 1. 9        |                  |
| Methanol              |                       | 80. 1 ± 2. 4        |                  |
| DMSO                  |                       | $63.0 \pm 2.8$      |                  |

a: All values are means  $\pm$  SD from three independent experiments. The surfactant and organic solvents concentration of isopropanol, Tween-20, Tween-80, Tritonx-100, methanol and DMSO were at 1% (V/V).

如表 4 所示, Man<sub>B</sub>对几种中性蛋白酶都表现出强烈的抗性。将其分别与胰蛋白酶和蛋白酶 K 于 pH7. 0 下孵育 2 h 后, 仍能保留初始酶活的 95. 4%和 66. 1%。然而,将其与胃蛋白酶于 pH2. 0 下孵育 2 h 后, 其酶活几乎为零。

表 4. 不同的蛋白酶对 Man<sub>R</sub>酶活的影响

Table 4. Effect of proteases on the Man<sub>B</sub> activity

| Proteases  | Relative activity/% <sup>a</sup> |
|------------|----------------------------------|
| None       | 100. 0                           |
| Pepsin     | $0.4 \pm 0.1$                    |
| Trypsin    | $95.4 \pm 2.7$                   |
| Protease K | 66. 1 ± 1. 4                     |

a: All values are means  $\pm$  SD from three independent experiments.

通过改变底物角豆胶的浓度,利用 Lineweaver Burk 双倒数法(图 7),测定  $Man_B$ 的酶反应动力学参数  $K_m$  和  $V_{max}$ 分别为 35. 7 mg/mL 和 14. 9  $\mu mol/(mL \cdot min)$ 。

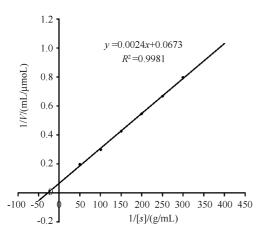


图 7. 双倒数曲线

Figure 7. Lineweaver-Burk.

## 2.4 man<sub>B</sub>在枯草芽孢杆菌中的表达

与大肠杆菌表达系统相比,枯草芽胞杆菌表达 系统可以有效地将重组蛋白分泌到细胞外。

我们利用大肠杆菌-枯草芽胞杆菌穿梭载体pHT43,将 man<sub>B</sub> 在枯草芽孢杆菌中表达。载体pHT43 的强启动子 Pgrac 由启动子 groESL 与其下游的乳糖操纵子融合而成,使其可以通过 IPTG 来诱导蛋白的表达。将 man<sub>B</sub>基因整合于 Pgrac 的下游,并在枯草芽胞杆菌 WB800N 中进行表达。IPTG 诱导表达 24 h 后,菌体裂解液中甘露聚糖酶酶活可达413.3 U/mL,而培养液上清中甘露聚糖酶酶活可达389.3 U/mL,约为总酶活的 94%。在未经 IPTG 诱导

的培养液或携带 pHT43 空载体的枯草芽胞杆菌 WB800N 培养液中,无法检测到甘露聚糖酶酶活。可以证明,甘露聚糖酶成功地在枯草芽胞杆菌 WB800N 中得到表达。重组蛋白经 SDS-PAGE 分析,分子量约为 42 kDa,与预测大小相一致(图 5-C)。

# 3 讨论

臭豆腐是大家熟知的中国传统发酵食物。之前有文献报道过,臭豆腐在发酵过程中会产生氨气,导致 pH 升至8.0 到9.0 之间,属于碱性发酵。芽孢杆菌通常会参与臭豆腐的发酵<sup>[6]</sup>。本文中,从臭豆腐卤液中分离出一株具有强甘露聚糖水解能力短小芽孢杆菌 Nsic-2,将 Nsic-2 中编码甘露聚糖酶的基因克隆出来,成功地在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中进行了表达,且重组蛋白的酶活相对于原宿主短小芽孢杆菌发酵液的甘露聚糖酶酶活(10.2 U/mL)均有明显提高。在枯草芽孢杆菌表达系统中,甘露聚糖酶可以分泌表达,但表达水平和酶活却远低于其在大肠杆菌中的表达。我们以前报道的将 man<sub>B</sub> 于枯草芽孢杆菌中表达,也同样检测到较低的酶活<sup>[21]</sup>。鉴于重组菌 BL21-pET-28a-man<sub>B</sub> 中甘露聚糖酶酶活最高,我们以此为例来研究酶学性质。

目前,已有一些文献报道过不同芽孢杆菌来源的甘露聚糖酶的性质(表5),包括环状芽孢杆菌<sup>[22,31]</sup>,地 衣 芽 孢 杆 菌<sup>[16]</sup>,枯 草 芽 孢 杆菌<sup>[12,15,23-24,30,32-33]</sup>和嗜热脂肪芽孢杆菌<sup>[25]</sup>。它们的酶活(从4.9到8300 U/mg),最适反应 pH,最适反应温度和酶反应动力学参数都明显不同。由于检测甘露聚糖酶活性时常用的底物角豆胶具有粘稠的特性,难于配制,有人推测一些报道中酶活差异大有一部分是由配制底物的方法不同引起的<sup>[16]</sup>。

但对于短小芽孢杆菌来源的甘露聚糖酶的重组表达及酶学性质的详细描述,还无人报道。重组菌BL21-pET-28a- $man_B$  表达的甘露聚糖酶纯化后,测定其最适反应温度为 $40^{\circ}$  ,与之前报道过的芽孢杆菌  $M50^{[26]}$  和  $B36^{[23]}$  相似,比环状芽孢杆菌 NT 6.7 ( $50^{\circ}$  ) [31] ,枯草芽孢杆菌  $B23(50^{\circ}$  ) [34] ,嗜热脂肪芽孢杆菌[25] 和类芽孢杆菌  $BME-14^{[27]}$  低 ( $60^{\circ}$  ),比多粘类芽孢杆菌稍高( $37^{\circ}$  ) [28] 。其热稳定性与来源于多粘类芽孢杆菌[29] ,芽孢杆菌

M50<sup>[26]</sup>和 WY34<sup>[12]</sup>中的甘露聚糖酶(<50 ℃)相似。Man<sub>B</sub>的最适反应 pH 为 6.0,与芽孢杆菌 WY34<sup>[12]</sup>,环状芽孢杆菌 NT 6.7<sup>[31]</sup>,芽孢杆菌 BS5<sup>[32]</sup>和芽孢杆菌 MAFIC-S11<sup>[33]</sup>来源的甘露聚糖

酶相似。与其它的芽孢杆菌甘露聚糖酶差异较大。如芽孢杆菌 Z-2 来源的甘露聚糖酶最适反应 pH 为  $4.0^{[30]}$ ,芽孢杆菌 B36 来源的为  $6.4^{[23]}$ ,芽孢杆菌 JAMB-750 来源的为  $10.0^{[35]}$ 。

表 5. 不同芽孢杆菌来源的甘露聚糖酶的性质

Table 5. Properties of various mannanases from Bacillus sp.

| <u> </u>   |           |                |   |                            |            |
|--|-----------|----------------|---|----------------------------|------------|
| Strains  | GH family | Activity       | Kinetics of the enzymic reaction                                | Optimal or<br>stability pH | Ref.       |
| Bacillus subtilis WY34                           | -         | 8302. 4 U/mg   | $K_{\rm m}$ 7. 6 ± 0. 2 mg/mL/ $V_{\rm max}$ 970 ± 10. 3 U/mg   | 6. 0                       | [12]       |
| Bacillus subtilis WL-3                           | 26        | 5900 U/mg      | ND  | 6. 0                       | [15]       |
| $\it Bacillus\ licheniformis\ DSM13$ and DSM8785 | 26        | 1560 U/mg      | $K_{\rm m}$ 17.5 mg/mL/ $V_{\rm max}$ 45300 U/mg                | 6.0 – 7.0                  | [16]       |
| Bacillus circulans CGMCC 1416                    | 5         | 481.55 U/mg    | ND  | 7. 6                       | [22]       |
| Bacillus subtilis B36                            | -         | 927.84 U/mg    | ND  | 6. 4                       | [23]       |
| Bacillus subtilis NM-39                          | 26        | 4.9 U/mL       | ND  | ND                         | [24]       |
| Bacillus stearothermophilus                      | 5         | 100 U/mg       | $K_{\rm m}~2~{ m mg/mL/}V_{ m max}~400~{ m U/mg}$               | 5.5 - 7.5                  | [25]       |
| Bacillus subtilis Z-2                            | 26        | 40 U/mL        | $K_{\rm m}$ 10. 2 mg/mL/ $k_{\rm cat}$ 3672 S $^{-1}$           | 4. 5                       | [30]       |
| Bacillus circulans NT 6.7                        | 26        | 902. 5 U/mg    | -   | 6. 0                       | [31]       |
| Bacillus subtilis BS5                            | -         | 7978 U/mg      | -   | 6. 0                       | [32]       |
| Bacillus subtilis MAFIC-S11                      | -         | 3706 U/mg      | $K_{\rm m}$ 8 mg/mL / $V_{\rm max}$ 20000 U/mg                  | 6. 0                       | [33]       |
| Bacillus subtilis B23                            | -         | 215. 3 U/mg    | -   | 7. 0                       | [34]       |
| Bacillus pumilus Nsic-2                          | 26        | 4191 ±107 U/mg | $K_{\rm m}$ 35. 7 mg/mL/ $V_{\rm max}$ 14. 9 $\mu$ mol/(mL·min) | 6.0-9.0                    | This study |

<sup>\*</sup> ND: not determine, GH family: glycosyl hydrolase (GH) family.

酶的性质决定了它的应用价值,而最适反应 pH 是其应用的关键影响因素。通常情况下,酸性甘露 聚糖酶主要应用于食品和饲料工业中,而中性和碱 性甘露聚糖酶主要应用于咖啡萃取,石油钻探,洗涤 剂,纺织品和纸浆工业中[36]。在以前的报道中,细 菌,放线菌和真菌来源的甘露聚糖酶最适 pH 在酸 性到中性之间,如来源于芽孢杆菌 SA-22 的甘露聚 糖酶 (6.5)[37],来源于类芽孢杆菌 BME-14 (4.5)[27],来源于解凝乳类芽胞杆菌(4.0)[24],来源 于环状芽孢杆菌 NT 6.7<sup>[31]</sup>。通常,真菌来源的甘露 聚糖酶在酸性到中性 pH 范围内比较稳定,如来源 于草酸青霉菌 GZ-2 的甘露聚糖酶(4.0)[38]。也有 少数报道真菌甘露聚糖酶当 pH 升至 8.5 时酶活也 能保持稳定。对于如纸浆生产这种需要酶在碱性条 件下发挥作用的工业中,最适 pH 在酸性到中性之 间的甘露聚糖酶的应用就受到了很大的限制。我们 表达的甘露聚糖酶 Man<sub>B</sub>在 pH6.0 到 9.0 之间酶活 稳定,可以保留最大酶活的 70% 以上。即使 pH 升 至 10.0,其还可以保留最大酶活的 40% 左右。这个 特性使其在很多工业应用中具有很好的应用价值。

我们的数据表明,DTT 可以明显地提高 Man<sub>B</sub>的 活性,而 Cu<sup>2+</sup>可以明显地降低其活性。由于重金属 离子可以与硫氢根离子结合,形成硫醇盐。由此可以推测在 Man<sub>B</sub>的活性位点上可能有硫氢根离子。而 DTT 可以将蛋白中的硫氢根基团进行还原。由此可以进一步证明 Man<sub>B</sub>的活性位点中有硫氢根基团。

很多文献报道过甘露聚糖酶在大肠杆菌中表 达[14-16],却少有甘露聚糖酶于枯草芽孢杆菌中表达 的报道。同时,由于基因 mang来源于芽孢杆菌,在 淀粉酶信号肽的作用下,我们利用枯草芽孢杆菌表 达载体来分泌表达外源蛋白。与大肠杆菌相比,枯 草芽孢杆菌不会分泌毒素,没有致病性,被公认为安 全无毒的微生物。它的蛋白质分泌机制可以将重组 蛋白直接分泌到发酵液中,还具有易于基因操作,周 期短,适于大规模生产蛋白的工业应用等优点[17]。 虽然大肠杆菌也可以在细胞周质中表达重组蛋白并 将其分泌,但其分泌特性远不如枯草芽孢杆菌[17]。 有文献报道克隆出地衣芽孢杆菌 DSM13 中的 β-甘 露聚糖酶基因,并将其在大肠杆菌中表达[16]。但是 大部分重组蛋白都在细胞周质中,只有一小部分可 以在培养液中检测到。我们成功地将甘露聚糖酶在 枯草芽孢杆菌中表达,并且在培养液上清中检测到 了大部分重组蛋白(约占所有重组蛋白的94%)。

影响重组蛋白表达水平主要有以下几个因素:转录效率,mRNA 稳定性,翻译的效率和蛋白的稳定性。枯草芽孢杆菌表达的甘露聚糖酶酶活远小于大肠杆菌中表达的甘露聚糖酶。这可能是由于重组蛋白的折叠不正确或枯草芽孢杆菌释放的外源蛋白可以识别并降解异源蛋白。

总结本研究的工作,从臭豆腐卤液中富集得到六个菌株,并将其中具有强甘露聚糖酶代谢能力的菌株(短小芽孢杆菌 Nsic-2)分离,从中克隆出甘露聚糖酶基因,将其成功地在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中表达。还将甘露聚糖酶纯化,研究了纯酶的酶学性质。与其它甘露聚糖酶相比,Man<sub>B</sub>在 pH6.0 - 9.0 的条件下酶活稳定。Man<sub>B</sub>在碱性条件下的稳定性使得其在很多工业中表现出潜在的应用价值。未来我们将会把研究重点放在其用于纸浆工业中的应用,并研究其功能与结构之间的关系。除此之外,还会进一步优化 man<sub>B</sub>在枯草芽孢杆菌中的表达策略。

# 参考文献

- [ 1 ] Saha BC. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2003, 30(5): 279-291.
- [ 2 ] Kuhad RC, Singh A, Eriksson KEL. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls//Biotechnology in the pulp and paper industry: advances in biochemical engineering/biotechnology. Berlin Heidelberg: Springer, 1997, 57: 45-125.
- [ 3 ] Moreira LRS, Filho EXF. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 79(2): 165-178.
- [4] Sittikijyothin W, Torres D, Gonçalves MP. Modelling the rheological behaviour of galactomannan aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*, 2005, 59(3): 339-350.
- [ 5 ] McCleary BV. Purification of (1→3), (1→4)-β-D-glucan from barley flour. Methods in Enzymology, 1988, 160: 511-514.
- [6] Puls J. Chemistry and biochemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. *Macromolecular Symposia*, 1997, 120(1): 183-196.
- [7] Mendoza NS, Arai M, Kawaguchi T, Cubol FS, Panerio EG, Yoshida T, Joson LM. Isolation of mannan-utilizing bacteria and the culture conditions for mannanase production. World Journal of Microbiology and

- Biotechnology, 1994, 10(1): 51-54.
- [8] El-Helow ER, Khattab AA. The development of a Bacillus subtilis 168 culture condition for enhanced and accelerated beta-mannanase production. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 1996, 43 (4): 289-299.
- [ 9 ] Baldaro E, Gallucci M, Formantici C, Issi L, Cheroni S, Galante YM. Enzymatic improvement of guar-based thickener for better-quality silk screen printing. *Coloration Technology*, 2012, 128(4): 315-322.
- [10] Benech RO, Li XM, Patton D, Powlowski J, Storms R, Bourbonnais R, Paice M, Tsang A. Recombinant expression, characterization, and pulp prebleaching property of a *Phanerochaete chrysosporium* endo-β-1, 4mannanase. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 41 (6/7): 740-747.
- [11] Zangiabadi H, Torki M. The effect of a β-mannanase-based enzyme on growth performance and humoral immune response of broiler chickens fed diets containing graded levels of whole dates. Tropical Animal Health and Production, 2010, 42(6): 1209-1217.
- [12] Jiang ZQ, Wei Y, Li DY, Li LT, Chai PP, Kusakabe I. High-level production, purification and characterization of a thermostable β-mannanase from the newly isolated Bacillus subtilis WY34. Carbohydrate Polymers, 2006, 66 (1): 88-96.
- [13] Titapoka S, Keawsompong S, Haltrich D, Nitisinprasert S. Selection and characterization of mannanase-producing bacteria useful for the formation of prebiotic mannooligosaccharides from copra meal. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24 (8): 1425-1433.
- [14] Yan XX, An XM, Gui LL, Liang DC. From structure to function: insights into the catalytic substrate specificity and thermostability displayed by *Bacillus subtilis* mannanase BCman. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 379(3): 535-544.
- [15] Yoon KH, Chung S, Lim BL. Characterization of the Bacillus subtilis WL-3 mannanase from a recombinant Escherichia coli. The Journal of Microbiology, 2008, 46 (3): 344-349.
- [16] Songsiriritthigul C, Buranabanyat B, Haltrich D, Yamabhai M. Efficient recombinant expression and secretion of a thermostable GH26 mannan endo-1, 4-β-mannosidase from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli. Microbial Cell Factories*, 2010, 9: 20.

- [17] Kim JH, Hwang BY, Roh J, Lee JK, Kim K, Wong SL, Yun H, Lee SG, Kim BG. Comparison of  $P_{aprE}$ ,  $P_{amyE}$ , and  $P_{P43}$  promoter strength for  $\beta$ -galactosidase and staphylokinase expression in *Bacillus subtilis*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2008, 13(3): 313-318.
- [18] Wei W, Ma J, Guo S, Wei DZ. A type I pullulanase of *Bacillus cereus* Nws-bc5 screening from stinky tofu brine: functional expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* and enzyme characterization. *Process Biochemistry*, 2014, 49(11): 1893-1902.
- [19] Sambrook JF, Russel DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Third Edition. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [20] Cai XH, Ma J, Wei DZ, Lin JP, Wei W. Functional expression of a novel alkaline-adapted lipase of *Bacillus* amyloliquefaciens from stinky tofu brine and development of immobilized enzyme for biodiesel production. *Antonie* van Leeuwenhoek, 2014, 106(5): 1049-1060.
- [21] Guo S, Tang JJ, Wei DZ, Wei W. Construction of a shuttle vector for protein secretory expression in *Bacillus subtilis* and the application of the mannanase functional heterologous expression. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014, 24(4): 431-439.
- [22] Li Y, Yang PL, Meng K, Wang YR, Luo HY, Wu NP, Fan YL, Yao B. Gene cloning, expression, and characterization of a novel β-mannanase from Bacillus circulans CGMCC 1416. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 18(1): 160-166.
- [23] Li YN, Meng K, Wang YR, Yao B. A β-mannanase from Bacillus subtilis B36: purification, properties, sequencing, gene cloning and expression in Escherichia coli. Zeitschrift Fur Naturforschung Section C-A Journal of Biosciences, 2006, 61 (11/12): 840-846.
- [24] Pason P, Kyu KL, Ratanakhanokchai K. Paenibacillus curdlanolyticus strain B-6 xylanolytic-cellulolytic enzyme system that degrades insoluble polysaccharides. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72 (4): 2483-2490.
- [25] Talbot G, Sygusch J. Purification and characterization of thermostable beta-mannanase and alpha-galactosidase from Bacillus stearothermophilus. Applied and Environmental Microbiology, 1990, 56(11): 3505-3510.
- [26] Chen YP, Long JE, Liao LH, Zhang YQ, Yang J. Study on the production of β-mannanase by *Bacillus* M50. *Acta Microbiologica Sinica*, 2000, 40 (1): 62-68. (in

- Chinese) 陈一平, 龙健儿, 廖连华, 张运强, 杨嘉. 芽孢杆菌 M50产生 β-甘露聚糖酶的条件研究. 微生物学报, 2000, 40(1); 62-68.
- [27] Fu XY, Huang XL, Liu PF, Lin L, Wu GB, Li CJ, Feng CF, Hong YZ. Cloning and characterization of a novel mannanase from *Paenibacillus* sp. BME-14. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 20(3): 518-524.
- [28] Stoll D, Stålbrand H, Warren RAJ. Mannan-degrading enzymes from *Cellulomonas fimi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(6): 2598-2605.
- [29] Cho KM, Hong SY, Lee SM, Kim YH, Kahng GG, Kim H, Yun HD. A cel44C-man26A gene of endophytic Paenibacillus polymyxa GS01 has multi-glycosyl hydrolases in two catalytic domains. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 73(3): 618-630.
- [30] Zhang Q, Yan X, Zhang L, Tang W. Cloning, sequence analysis, and heterologous expression of a β-mannanase gene from *Bacillus subtilis* Z-2. *Molecular Biology*, 2006, 40(3): 368-374.
- [31] Piwpankaew Y, Sakulsirirat S, Nitisinprasert S, Nguyen TH, Haltrich D, Keawsompong S. Cloning, secretory expression and characterization of recombinant β-mannanase from Bacillus circulans NT 6. 7. SpringerPlus, 2014, 3; 430.
- [32] Li RK, Chen P, Ng TB, Yang J, Lin J, Yan F, Ye XY. Highly efficient expression and characterization of a β-mannanase from *Bacillus subtilis* in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2015, 62 (1): 64-70.
- [33] Lv JN, Chen YQ, Pei HL, Yang WH, Li ZM, Dong B, Cao YH. Cloning, expression, and characterization of β-mannanase from *Bacillus subtilis* MAFIC-S11 in *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 169(8): 2326-2340.
- [34] Zhou HY, Yang Y, Nie X, Yang WJ, Wu YY. Comparison of expression systems for the extracellular production of mannanase Man23 originated from *Bacillus* subtilis B23. Microbial Cell Factories, 2013, 12: 78.
- [35] Takeda N, Hirasawa K, Uchimura K, Nogi Y, Hatada Y, Usami R, Yoshida Y, Grant WD, Ito S, Horikoshi K. Purification and enzymatic properties of a highly alkaline mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain JAMB-750. *Journal of Biological Macromolecules*, 2004, 4(2): 67-74.
- [36] Chen XL, Cao YH, Ding YH, Lu WQ, Li DF. Cloning,

- functional expression and characterization of Aspergillus sulphureus  $\beta$ -mannanase in Pichia pastoris. Journal of Biotechnology, 2007, 128(3): 452-461.
- [37] Yu HY, Sun YM, Wang WJ, Yang YS, Yang YH. Purification and properties of *Bacillus subtilis* SA-22 endo-1, 4-β-D-mannanase. *Chinese Journal of Biotechnology*,
- 2003, 19(3): 327-330.
- [38] Liao HP, Li SX, Zheng HP, Wei Z, Liu DY, Raza W, Shen QR, Xu YC. A new acidophilic thermostable endo-1, 4-β-mannanase from *Penicillium oxalicum* GZ-2: cloning, characterization and functional expression in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnology*, 2014, 14(1): 90.

# Alkaline-adapted beta-mannanase of *Bacillus pumilus*: gene heterologous expression and enzyme characterization

Jiajie  $\mathrm{Tang}^{1,2}\,,~\mathrm{Su}~\mathrm{Guo}^{1,2}\,,~\mathrm{Wei}~\mathrm{Wang}^{1,2}\,,~\mathrm{Wei}~\mathrm{Wei}^{1,2\,*}\,,~\mathrm{Dongzhi}~\mathrm{Wei}^{1,2}$ 

Abstract: Objective We expressed a novel alkaline-adapted beta-mannanase gene and characterized the enzyme for potential industrial applications. [Methods] We obtained a mannanase gene (named  $man_B$ ) from  $Bacillus\ pumilus\ Nsic-2$  and expressed the gene  $man_B$  in  $Escherichia\ coli$  and  $Escherichia\ subtilis$ . Furthermore, we characterized the enzyme. [Results] The gene  $man_B$  had an open reading frame of 1104 bp that encoded a polypeptide of 367-amino-acid beta-mannanase (Man<sub>B</sub>). The protein sequence showed the highest identity with the beta-mannanase from  $Escherichia\ CCAM080065$ . We expressed the gene  $man_B$  in  $Escherichia\ Coli\ BL21\ (DE3)$  with the enzyme activity of 11021.3 U/mL. Compared with other mannanases,  $Escherichia\ Coli\ BL21\ (DE3)$  with the enzyme activity of 11021.3 U/mL. The specific activity of purified  $Escherichia\ Coli\ BL21\ (DE3)$  with the enzyme activity of 11021.3 U/mL. The specific activity of purified  $Escherichia\ Coli\ BL21\ (DE3)$  with the enzyme activity of 11021.3 U/mL. Compared with other mannanases,  $Escherichia\ Coli\ BL21\ (DE3)$  with the enzyme activity of 11021.3 U/mL. Compared with other mannanases,  $Escherichia\ Coli\ BL21\ (DE3)$  with the enzyme activity of 11021.3 U/mL. Compared with other mannanases,  $Escherichia\ Coli\ BL21\ (DE3)$  with the enzyme activity of 11021.3 U/mL. Compared with other mannanases,  $Escherichia\ Coli\ BL21\ (DE3)$  with the enzyme activity of 11021.3 U/mL. Compared with other mannanases,  $Escherichia\ Coli\ BL21\ (DE3)$  with the enzyme activity of 11021.3 U/mL.  $Escherichia\ Coli\ BL21\ (DE3)$  with the enzyme activity of 11021.3 U/mL.  $Escherichia\ Coli\ BL21\ (DE3)$  with the enzyme activity of 11021.3 U/mL.  $Escherichia\ Coli\ BL21\ (DE3)$  with the enzyme activity of 11021.3 U/mL.  $Escherichia\ Coli\ BL21\ (DE3)$  with the enzyme activity of 11021.3 U/mL.  $Escherichia\ Coli\ BL21\ (DE3)$  with the enzyme activity of 11021.3 U/mL.  $Escherichia\ Coli\ BL21\ (DE3)$  with the enzyme activity of 11021.3 U/mL.  $Escherichia\ Coli\ BL21\ (DE$ 

**Keywords**: Bacillus pumilus, β-mannanase, gene cloning, enzymatic properties, Bacillus subtilis expression

(本文责编:张晓丽)

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

Supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (WF1214047), by the National Natural Science Foundation of China (C050203 – 31200596), by the National High Technology Research and Development Program of China (2013AA102109) and by the National major science and technology projects of China (2012ZX09304009)

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel/Fax: +86-21-64251803; E-mail: lyuwei-1982@hotmail.com Received: 27 April 2015/Revised: 29 June 2015